

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001 年 5 月 3 日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/30341 A1(51) 国際特許分類:
31/12, A61P 43/00, 35/00 A61K 31/352,

東ヶ丘2-5-28 国立がんセンター宿舎RG-401 Tokyo (JP). 小松 一 (KOMATSU, Hajime) [JP/JP]; 〒781-6421 高知県安芸郡安田町大字安田1690-2 Kochi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07462

(22) 国際出願日: 2000 年 10 月 25 日 (25.10.2000)

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/302979
1999 年 10 月 25 日 (25.10.1999) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立がんセンター総長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒104-0045 東京都中央区築地5丁目1番1号 Tokyo (JP). 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 (THE ORGANIZATION FOR PHARMACEUTICAL SAFETY AND RESEARCH) [JP/JP]; 〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル9階 Tokyo (JP).

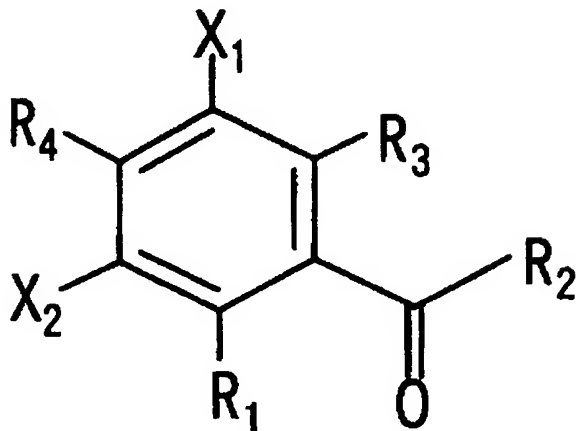
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 若林敬二 (WAKABAYASHI, Keiji) [JP/JP]; 〒152-0021 東京都目黒区

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION INHIBITORS

(54) 発明の名称: シクロオキシゲナーゼ-2発現抑制剤



(1)

(57) Abstract: COX-2 expression inhibitors which contain as the active ingredient dihydroxyacetophenone derivatives represented by the following general formula (1). These COX-2 expression inhibitors are useful in preventing cancer associated with the overexpression of COX-2 such as colon cancer.



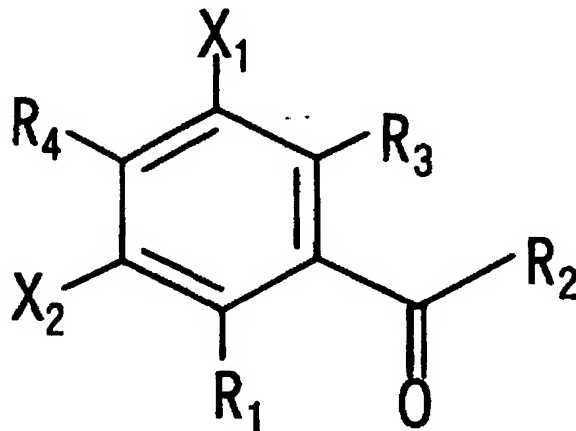
WO 01/30341 A1



(57) 要約:

下記一般式（１）で示されるジヒドロキシアセトフェノン誘導体を有効成分として含有する COX-2 発現抑制剤。本発明の COX-2 発現抑制剤は、大腸癌等の COX-2 の過剰発現を伴う癌の予防に有用である。

一般式（１）



明細書

シクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤

技術分野

本発明は、癌の予防や炎症症状の緩和に有用なシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤に関する。

背景技術

非ステロイド系抗炎症剤（以下、NSAID と記載する）は、抗炎症剤や鎮痛剤として広く利用されている薬剤である。NSAID は、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ（以下、COX と省略する）の酵素活性阻害を通じて抗炎症作用を示すとされている。プロスタグランジン E2 のような炎症性のケミカルメディエーターは、アラキドン酸を基質として COX の作用によって合成されている。COX には、異なる遺伝子の産物である COX-1 と COX-2 の存在が知られている。COX-1 は消化器系の臓器で広く発現が見られるのに対して、COX-2 は炎症病巣などにおいて局所的に発現が誘導される。COX-2 の誘導には、サイトカイン(J. Biol. Chem. 1990, 265:10805-10808)、マイトジェン、あるいは内毒素(J. Biol. Chem. 1992, 267:25934-25938)等が関与している。抗炎症剤であるアスピリンは、COX-1 と COX-2 のいずれに対しても同様に酵素活性を阻害するために、胃腸障害等の副作用が生じると考えられている(Arch. Intern. Med. 1987, 147:85-88)。そのため最近開発されている COX-2 選択的な活性阻害剤は、これまでの非選択的な COX 阻害剤に共通する副作用を減ずることができるのではないかと期待されている。

更に活性阻害剤のみならず、COX-2 の発現そのものを選択的に阻害することができる薬剤は、COX-2 選択的な活性阻害剤と同様に副作用の少ない抗炎症剤として有用であると考えられる。しかし、COX-2 の発現を抑制する化合物に関する報

- 2 -

告は少ない。たとえば本発明者らは、COX-2 プロモーターの下流にレポーター遺伝子を配置したベクターで形質転換した大腸癌細胞を用い、COX-2 の転写抑制活性物質のスクリーニング方法確立した(J.Ethnopharmacology,66:227-233,1999)。しかしこの方法で COX-2 の転写阻害活性が確認された化合物は、わずかにベルベリン(berberine)のみである。そのため、COX-2 選択阻害剤に必要な基本構造を特定することは、現状では困難である。基本構造の特定と、発現抑制作用に関与する置換基の情報を蓄積することは、薬剤としての有効性を高める上で不可欠なことである。

たとえばフラボノイド類には、抗アレルギー、抗炎症、抗ウイルス、抗増殖、あるいは抗癌作用を持つ化合物が存在することが知られている。しかしこのような一般的な情報に基づいて、COX-2 の発現抑制に有効な基本構造を特定することはできない。

更に、ゲニステイン、レスベラトロール、アピゲニン、ケンフェロール、ケルセチン(Carcinogenesis 20,1945-1952,1999)などのポリフェノール、あるいはステロイド剤や一部の免疫抑制剤などには、COX-2 発現抑制作用が認められている。しかし各化合物の作用メカニズムについての知見は得られているものの、構造的な特徴と COX-2 抑制作用の関連性についての情報は蓄積されていない。したがって、現在までに得られている知見をもとに構造-活性相関の研究を行うことはできない。これまでは、COX-2 発現抑制作用の確認のためには、ゲルシフトアッセイやノーザンブロット法が利用されていた。これらの手法は、本発明で用いたレポーター遺伝子アッセイと比べると操作が煩雑で、多くの化合物を処理するには不向きである。つまり、COX-2 発現抑制剤については、構造-活性相関を可能とする情報の蓄積は、一般的な手法では困難であったとすることができる。

さて、近年の疫学的調査によれば、NSAID の代表的薬剤であるアスピリンの長期服用者で大腸癌死亡率が 30-40%減少することが報告された(Cancer Res.1993, 53:1322-1327)。加えて、正常な消化器系の組織では COX-2 の発現は見られない

- 3 -

が、大腸癌では COX-2 の発現が誘導されていることが明らかにされている(Cancer Res.1995,55:2556-2559, Cancer Res.1995,55:3785-3789)。したがって、NSAID による大腸癌死亡率の低下は、その COX-2 阻害作用に基づくものであることが推測されている。更に、COX-2 の発現の阻害を通じて大腸癌の化学的な予防(chemoprevention)、あるいはポリープの治療が可能となることを強く示唆する。このように COX-2 の発現阻害剤には、大腸癌の予防や治療に応用できる可能性があり、医薬として利用することができる候補化合物の提供が望まれている。

発明の開示

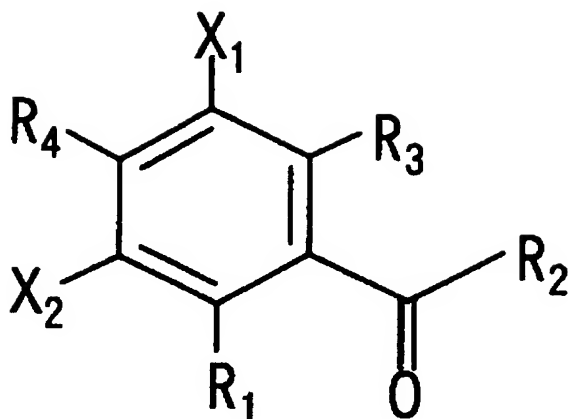
本発明の課題は、COX-2 の発現抑制に必要な基本構造を明らかにするとともに、COX-2 の発現抑制に有効な薬剤を提供することにある。

本発明者らは、COX-2 の発現抑制活性を持つ化合物のスクリーニング法として、レポーター遺伝子を導入したヒト大腸癌細胞株を用いる方法(J.Ethnopharmacology,1999,66:227-233)を既に確立している。この方法では、COX-2 プロモーターの下流に β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子を連結したベクターで形質転換した大腸癌細胞を用いる。この方法により、COX-2 の発現レベルに与える被検化合物の影響を、 β ガラクトシダーゼ活性として *in vitro* で評価することができる。本発明者らは、このスクリーニング方法によってフラボノイド類を含むいくつかの化合物について COX-2 遺伝子の発現抑制作用について評価し、その活性の大きさと被検化合物の構造との関係を解析した。そして、COX-2 遺伝子の発現抑制作用に必要な基本的な構造を見出し、更にその作用に影響を与える構造的な特徴を明らかにして本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の COX-2 発現抑制剤に関する。

〔1〕下記一般式(1)で示されるジヒドロキシアセトフェノン誘導体、またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する COX-2 発現抑制剤。

一般式(1)

- 4 -



式中、X1 と X2 は、同時にまたは独立して水素原子、またはハロゲン、
R1 は、水素原子または水酸基、
R2 は、アルキル基、または置換アルキル基、
R3 は、水素原子、水酸基、オキシアルキル基、または R2 のアルキル基または置換アルキル基と環を形成しても良いオキシアルキル基もしくは水酸基、および
R4 は、水酸基、またはオキシアルキル基を示す、
ただし、R1、R3、および R4 の少なくとも一つは水酸基である
〔2〕 X1 と X2 が、同時にハロゲンである〔1〕に記載の COX-2 発現抑制剤。
〔3〕 ハロゲンが Br である〔2〕に記載の COX-2 発現抑制剤。
〔4〕 R2 が置換アルキル基である〔1〕に記載の COX-2 発現抑制剤。
〔5〕 置換アルキル基がハロゲン化メチル基、またはそのベンゼン環が 3 位と 4 位において水酸基で置換されているフェネチル基である〔4〕に記載の COX-2 発現抑制剤。

〔６〕一般式（１）で示される化合物が、ラムネチン、エリオチクチオール、ルテオリン、フィセチン、およびフロレチンからなる群から選択されるいずれかの化合物である〔１〕に記載の COX-2 発現抑制剤。

〔７〕〔１〕に記載の COX-2 発現抑制剤からなる、COX-2 を過剰発現している腫瘍の予防剤。

あるいは本発明は、前記一般式（１）で示される化合物の、COX-2 発現抑制剤の製造における使用に関する。また本発明は、前記一般式（１）で示される化合物を投与する工程を含む、COX-2 を過剰発現している腫瘍の予防方法に関する。

本発明の COX-2 発現抑制剤において有効成分とする化合物は、前記一般式（１）で示されるジヒドロキシアセトフェノン誘導体、またはその薬学的に許容される塩である。本発明者らは、一般式（１）で示される構造が COX-2 の阻害活性を維持する上で必要な構造であることを見出し、更にその作用と特に密接に関連する構造的特徴を明らかにした。具体的には、たとえば以下の３つの条件は、本発明の化合物による COX-2 の発現抑制作用を強化するために有効である。なお本発明において COX-2 の発現抑制とは、COX-2 遺伝子の転写と翻訳の過程のいずれかの段階を阻害する作用を意味する。

(a) A 環の 4 位(R4)には常に酸素を結合していること。

(b) A 環の 2 位(R1)、および 4 位(R4)に水酸基を持つ場合、3 位と 5 位は同時にハロゲンで置換されていることが望ましい。

(c) R2 としてベンジル基またはフェネチル基を伴う化合物においては、そのベンゼン環（B 環）が 3 位と 4 位において水酸基で置換されていることが望ましい。特に 4 位の水酸基は好ましい。

前記一般式（１）を構成する各置換基において、ハロゲンとは、F、Cl、Br、および I に代表される任意のハロゲン原子から選択される。本発明においてアルキル基とは、メチル基やエチル基等の低級アルキル基、あるいはベンジル基やフェネチル基のような芳香族アルキル基から選択される。これらのアルキル基は、

- 6 -

水酸基やハロゲン等で置換されていても良い。具体的には、R2 のアルキル基として、ベンジル、フェネチル、メチル、エチル、プロピル、あるいはイソプロピルを例示することができる。同じく R2 の置換アルキル基としては、ブロモメチルやメトオキシメチル等を例示することができる。また、R2 のアルキル基または置換アルキル基は、R3 の水酸基またはオキシアルキル基と環（C環）を形成することもできる。たとえば R2 がフェネチル基のとき、R3 の水酸基と環を構成することによって、クロモン母核(chromone)が形成され、フラボン(flavone)となる。

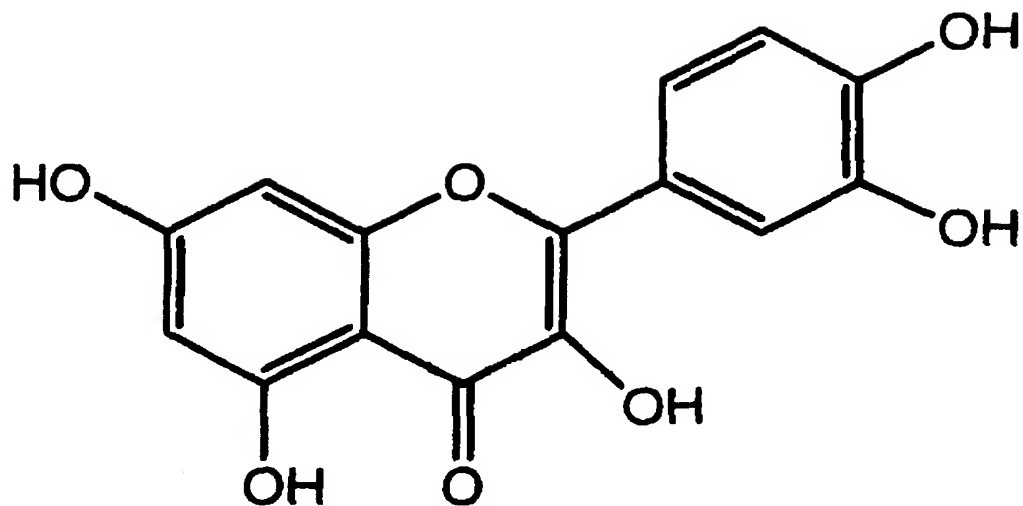
更に、前記一般式（1）において、X1 と X2 は、同時にまたは独立して水素原子、またはハロゲンであることができる。特に A 環の 2 位(R1)、および 4 位(R4)に水酸基を持つ場合、3 位(X2)と 5 位(X1)が同時にハロゲンで置換されていることが望ましい。中でも、X1 と X2 が同時に Br となるときは、高度な COX-2 発現阻害活性を達成できる。

前記一般式（1）で示される化合物は、公知の方法によって得ることができる。たとえば、R2 としてベンゼン環が 1 または 2 個の水酸基(-OH)で置換されたベンジル基やフェネチル基を備える一群の化合物は、フラボノイドと呼ばれる化合物である。フラボノイドには多くの植物に由来する様々な構造の化合物が報告されており、その中から前記一般式（1）によって与えられる構造を備えた化合物を選択することができる。本発明の COX-2 発現抑制剤に必要な化合物の多くは、市販されている。特にフラボノイドに属する化合物は、入手が容易である。また、これらの化合物を化学的に合成する方法も公知である。

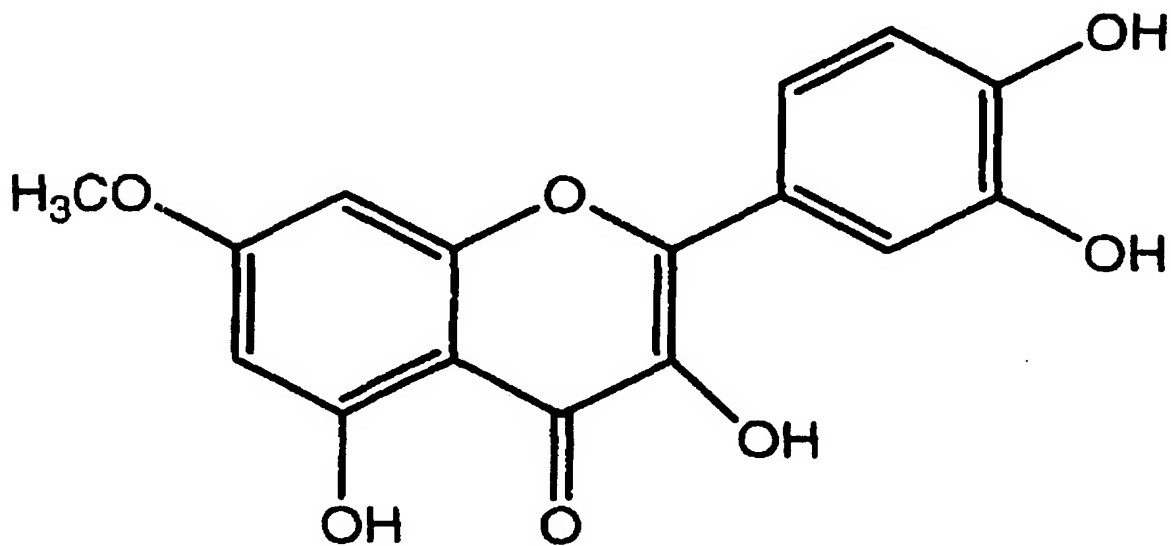
前記一般式（1）で示される化合物のうち、特に COX-2 発現抑制作用に優れる化合物として、次の化合物を例示することができる。

- 7 -

(I) ケルセチン

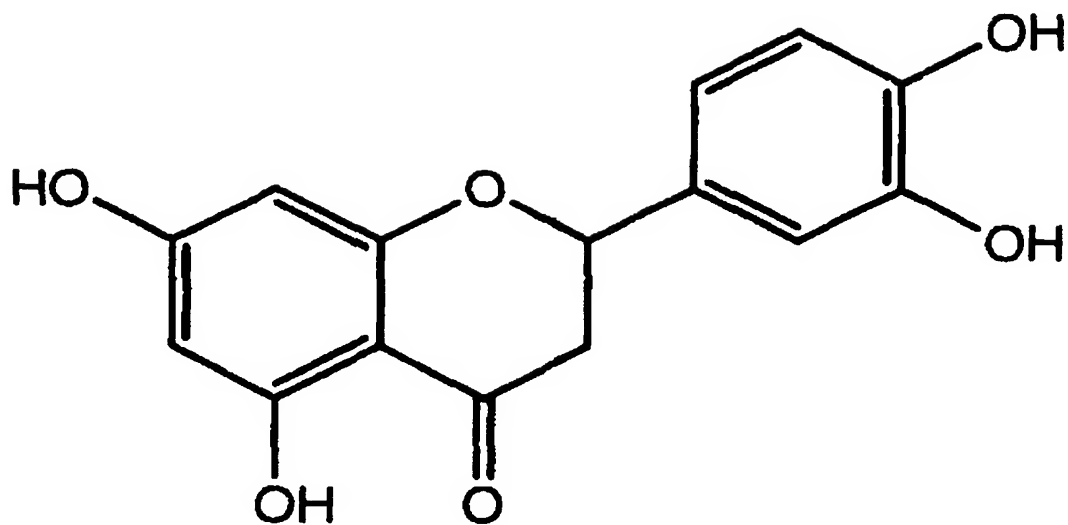


(II) ラムネチン

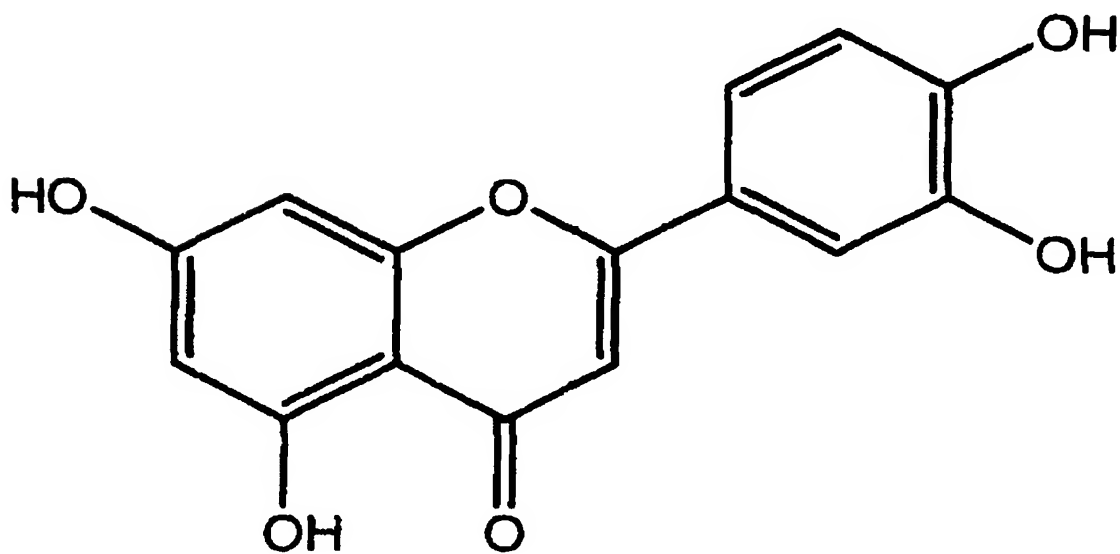


- 8 -

(III) エリオチクチオール

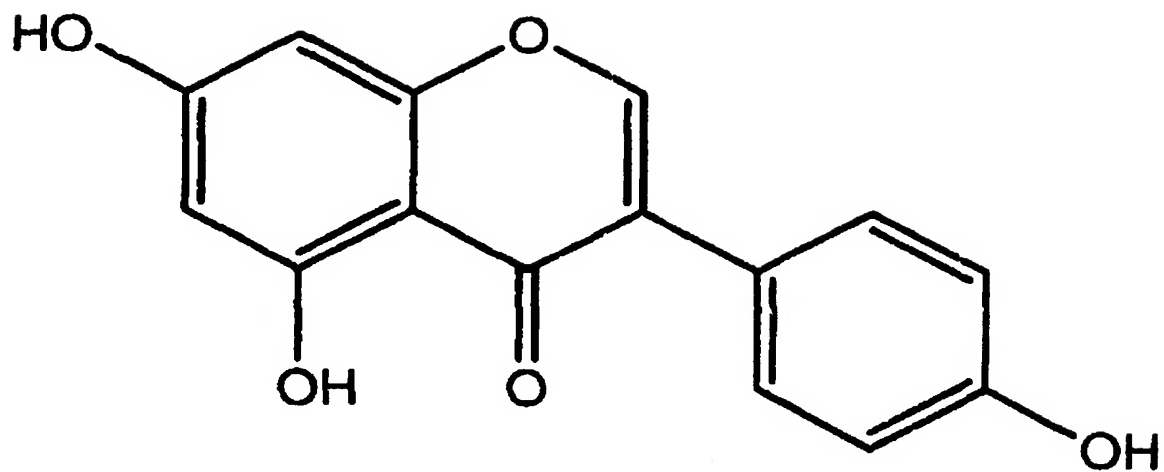


(IV) ルテオリン

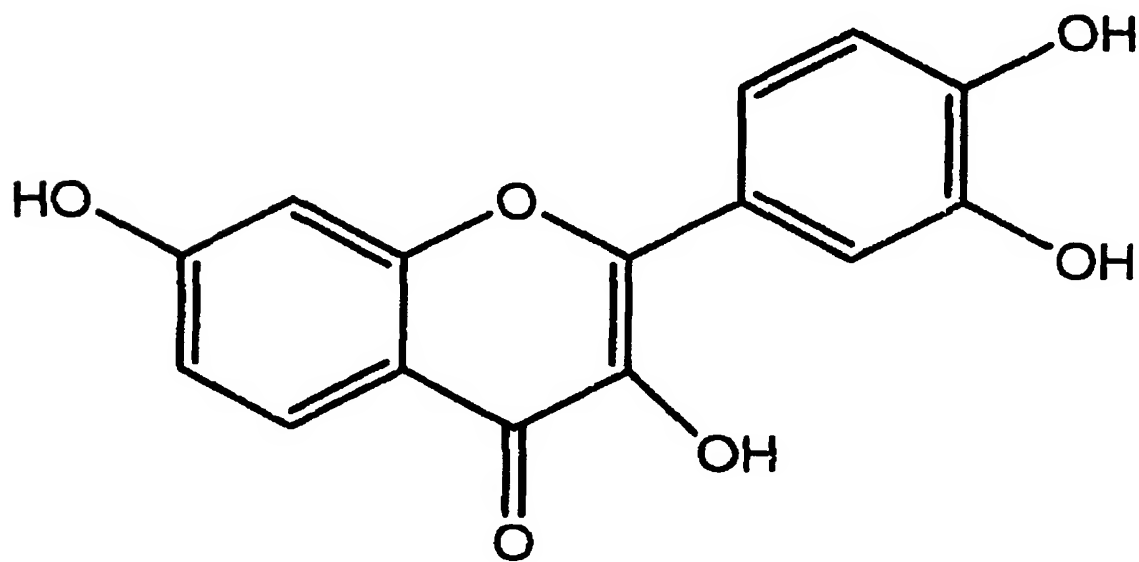


- 9 -

(V) ゲニステイン

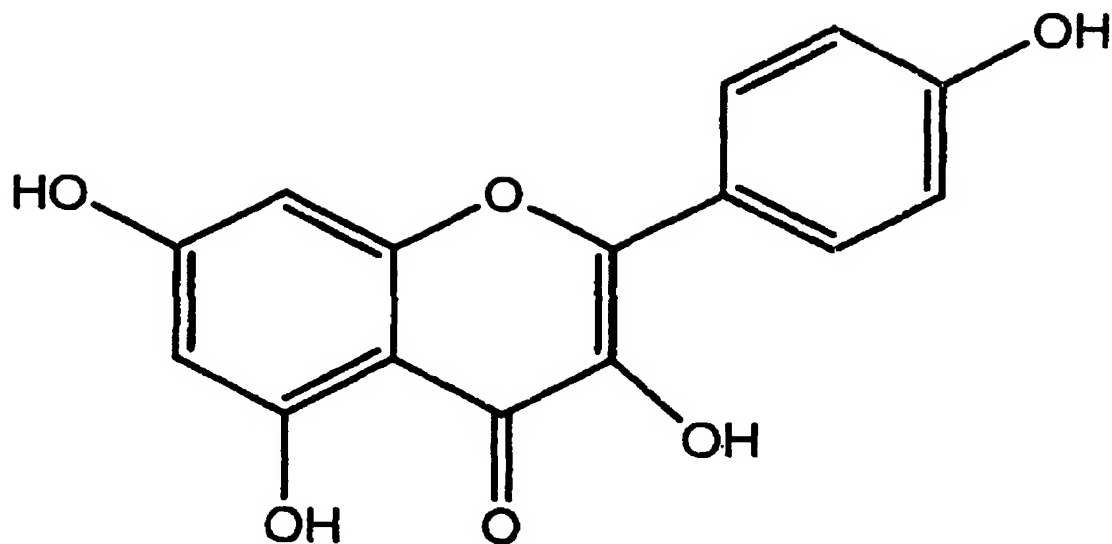


(VI) フィセチン

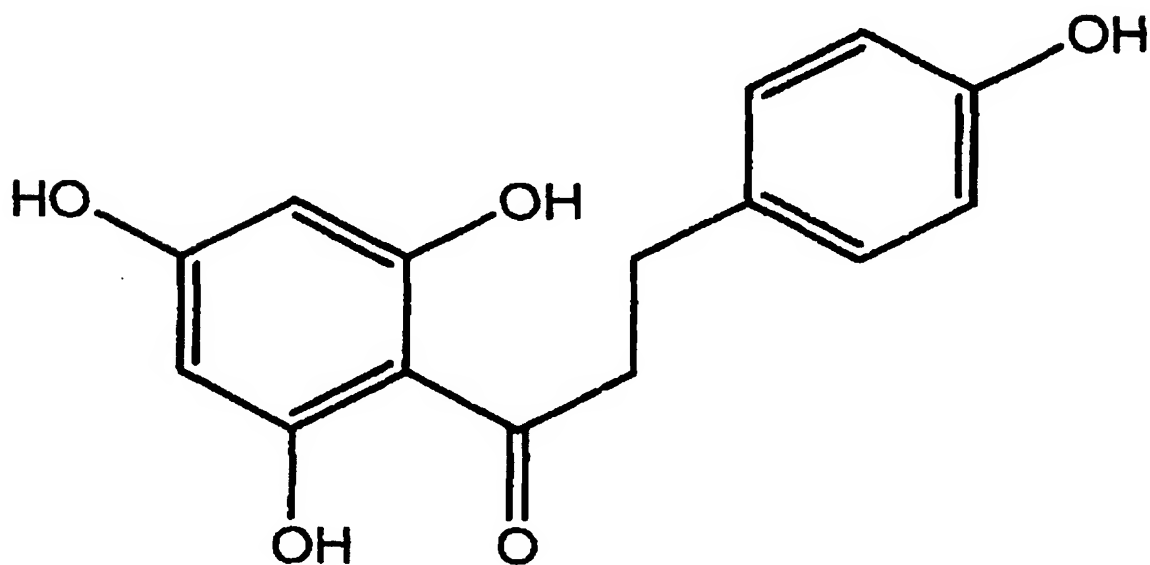


- 10 -

(VII) ケンフェロール



(VIII) フロレチン



これらの化合物のうち、次の5つの化合物は構造が公知のフラボノイド化合物である。しかしこれらのフラボノイドの抗癌作用や抗炎症作用がCOX-2の阻害に基づくものであることは知られていない。たとえばルテオリンが発癌抑制作用を

- 1 1 -

持つことは公知であるが、そのメカニズムは未知である(Cancer Letters, 1994, 87:107-113)。

ラムネチン、

エリオチクチオール、

ルテオリン、

フィセチン

フロレチン

またレスアセトフェノンも、その構造は公知であるが、COX-2 発現抑制作用を有していることは新規な知見である。更に、3,5-ジブロモ-2,4-ジヒドロキシアセトフェノンは、重金属分析用試薬に用いられる公知化合物である(J.Sci.Ind. Res., 1983, 18:66-75, J.Sci.Inst.Chem. India, 1984, 56:163-164)。しかし、やはり COX-2 の発現抑制作用を有することは知られていない。

本発明による COX-2 の発現抑制剤は、COX-2 の発現異常を伴う疾患の予防や治療において有用である。具体的には、たとえば大腸癌のような COX-2 を過剰発現している腫瘍一般の予防、あるいは炎症症状の緩和に利用することができる。大腸癌においては COX-2 の発現が亢進していることは既に述べた(Cancer Res. 1995, 55:2556-2559, Cancer Res. 1995, 55:3785-3789)。そして COX-2 の発現抑制が癌化の予防につながる可能性が指摘されている。したがって、COX-2 の発現抑制剤は、大腸癌の化学的な予防剤として有用である。また大腸癌のみならず、胃癌(Cancer Res. 57, 1276-80, 1997)、膵臓癌(Cancer Res. 59, 4356-62, 1999)、あるいは大腸腺腫症等においても COX-2 の過剰発現が報告されていることから、これらの癌に対しても本発明の癌の予防剤は有効である。本発明による COX-2 の発現抑制剤は、COX-2 の発現を制御することから、活性抑制剤よりも高い選択性を達成することができる。COX-2 と COX-1 は異なる遺伝子の産物であることから、一方の発現を制御する化合物が他方の発現に関与するとは考えにくいためである。活性

- 1 2 -

阻害剤においては、類似する活性を持つ異なる酵素の阻害を選択的に行うことが困難である。

本発明において COX-2 発現抑制活性を見出された化合物は、単独で、あるいは複数の化合物を組み合わせて、公知の製剤化技術を利用して医薬製剤とすることができる。すなわち、これらの化合物を薬学的に許容される賦形剤と配合することによって医薬製剤を得ることができる。

本発明の化合物はそのまま、あるいは慣用の製剤担体と共に動物および人に投与することができる。投与形態としては、特に限定がなく、必要に応じ適宜選択して使用される。具体的には、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、あるいは注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

経口剤は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等の賦形剤を用いて常法に従って製造される。この種の製剤には、適宜、前記賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができる。

また、本発明の化合物は、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤としても投与ことができ、これらの各種剤形には、矯味矯臭剤、着色剤を含有してもよい。

非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤を加えてもよい。その他の非経口剤としては、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、常法に従って製造される。

本発明による COX-2 発現抑制剤における有効成分の含有量は、選択された投与ルートによって必要な投与量を与えることができるように適宜調整することができる。具体的には、通常の投与量は、体重 1 kg あたり、0.001 μ g \sim 1 mg、

- 13 -

望ましくは $0.01 \mu\text{g} \sim 0.1 \text{mg}$ 、より望ましくは $0.1 \mu\text{g} \sim 0.01 \text{mg}$ を示すことができる。最終的な投与量は、投与の対象となる患者の、体重、年齢、性別、そして症状等を総合的に考慮して適宜調整される。

図面の簡単な説明

図1は、レスアセトフェノンおよび BHAP における、投与依存の COX-2 プロモーター転写活性の抑制効果を示す図。横軸は各化合物の濃度、縦軸は COX-2 プロモーター転写活性を表す。グラフ上のバーは SD を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら制限されるものではない。

〔実施例1〕COX-2 プロモーター転写活性の測定

12種のフラボノイド化合物について、本発明者らによって開発された系を利用して、ヒト大腸癌細胞における COX-2 プロモーター転写活性の抑制効果を調べた。

(1) 実験に使用した化合物

(+)-カテキン(catechin)、(-)-エピカテキン(epicatechin)、ミリセチン(myricetin)および $\text{TGF}\alpha$ は、Sigma Chemical 社(St.Louis, MO, U.S.A.)から購入した。エリオクチオール(eriodictyol)、フィセチン(fisetin)、ケンフェロール(kampferol)、ルテオリン(luteolin)、およびラムネチン(rhamnetin)は Extrasynthese (Genay, France)から購入した。ゲニステイン(genistein)は、Fujicco から購入した。フロレチン(phloretine)、ケルセチン(quercetin)、およびレスアセトフェノン(resacetophenone)は、和光純薬から購入した。エピガロカテキン(epigallocatechin)は、栗田工業株式会社から購入した。

(2) 細胞培養法

- 14 -

ヒト大腸腺癌細胞(human colon adenocarcinoma cell line)である DLD-1 は、「Health Science Research Resources Bank」から入手した。細胞を、5%熱処理不活化ウシ胎児血清(Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT)、および抗生物質(100 μ g/ml ストレプトマイシン、および 100 units/ml ペニシリン)を添加した RPMI1640 培地中で、37°C、5% CO₂で維持した。細胞(2.0 x 10⁵ cells/ml)を 96 穴組織培養プレート上にプレーティングし、24 時間前培養した。その後、細胞を被検化合物で処理した。

(3) 生細胞数の測定法 (MTT アッセイ)

各培養液の細胞生存度を、臭化 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-yl)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)アッセイ(Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol.Methods.65:55-63,1983)により決定した。被検化合物で処理した後、細胞をさらに 1 時間、0.5 mg/ml の MTT を含む培地でインキュベーションした。生細胞により生産される MTT ホルマザンを、ジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解させ、595 nm の吸光度を Microplate Reader (Bio-Rad)で測定した。

(4) COX-2 プロモーター転写活性の測定のためのリポーター遺伝子アッセイ系

ヒトゲノム DNA を、健常なボランティアから得た末梢性リンパ球から単離した。-2046~+32 (転写開始点からの相対的な位置) の長さを持ち、全ての既知の転写因子応答配列、および該当遺伝子の転写開始点を含む、2078 ヌクレオチドのヒト COX-2 遺伝子プロモーターを、市販の PCR キット (宝酒造) を用い、PCR 法により増幅した。ヒト COX-2 遺伝子の 5' 領域である -2046~+32 部位の 5' 末端の配列に相当する PCR プライマー (フォワードプライマー; 5' - GGAAGTCTTCACTCTATC CTGCTATATAAGGTGA -3' ; 配列番号: 1) 、および 3' 末端の配列に相当する PCR プライマー (アンチセンスプライマー; 5' - TCCTGACGCTCACTGCAATGCGTATGACAATT -3' ; 配列番号: 2) を、サワデーテクノロジー (株) で合成した。DNA 断片を、

- 15 -

lacZ 遺伝子およびプラスチシジン S デアミナーゼ (BSD) 遺伝子を有する pB2- β Gal-BSD 基本ベクターの、lacZ 遺伝子の上流サイトへ挿入した。この融合プラスミドを pCOX2/B2- β Gal-BSD と名づけた。

DLD-1 細胞を、pCOX2/B2- β Gal-BSD プラスミド DNA で形質転換した。まず、 2×10^6 DLD-1 細胞を、10 cm 培養皿で成長させた。一晩接着させた後、細胞を TfxTM-20 (Promega Corporation, Madison, WI) を利用し、製造元のマニュアルに従って、15 mg のプラスミド DNA で形質転換した。安定な形質転換細胞を、20 mg/ml のプラスチシジン S 塩酸 (Kaken Pharmaceutical Co. Ltd) を含む培地で選択した。DLD-1 細胞のゲノム DNA 中に pCOX2/B2- β Gal-BSD を持つ安定な形質転換細胞を、DLD-1/COX-2/B2- β Gal-BSD と名付けた。DLD-1/COX-2/B2- β Gal-BSD 細胞の遺伝子型がヘテロなポピュレーションから、限界希釈法により得たゲノム DNA 中に 2078 bp の COX-2 プロモーター領域、および lacZ 遺伝子の下流の正常な DNA 断片を含むサブクローンを実験に用いた。

細胞を、96穴マイクロタイタープレートに、ウェルあたり細胞数が 2×10^4 の密度になるように接種し、24時間前培養した。次に、細胞を被検化合物で処理し、各ウェルにおける DLD-1 細胞の全 β -ガラクトシダーゼ活性を、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を利用した比色アッセイにより測定した。DLD-1 細胞の基準となる β -ガラクトシダーゼ活性は、対照として被検化合物で処理していない DLD-1/COX-2/B2- β Gal-BSD 細胞で測定し、その値を 0 に設定した。TGF α で処理した DLD-1/COX-2/B2- β Gal-BSD の β -ガラクトシダーゼ活性を、100%として設定した。各被検化合物で処理した時の β -ガラクトシダーゼ活性のパーセンテージを、3つのウェルから算出した。 β -ガラクトシダーゼ活性の値を、前記 MTT アッセイによって評価した生存細胞数で補正した。最終的な最大投与量は、500 μ M であり、全実験は 3 回行い、IC₅₀ (n=3) を平均値 \pm SD としてグラフにプロットした。

(5) フラボノイド化合物による COX-2 プロモーター転写活性の抑制

- 16 -

このアッセイでは、COX-2 は成長因子の TGF α によって発現誘導される。フラボノイドの 6 つの代表的な化学分類に属する 12 の化合物について、終濃度 500 μ M で、COX-2 のプロモーター転写活性をテストした。その結果を表 1 に示す。

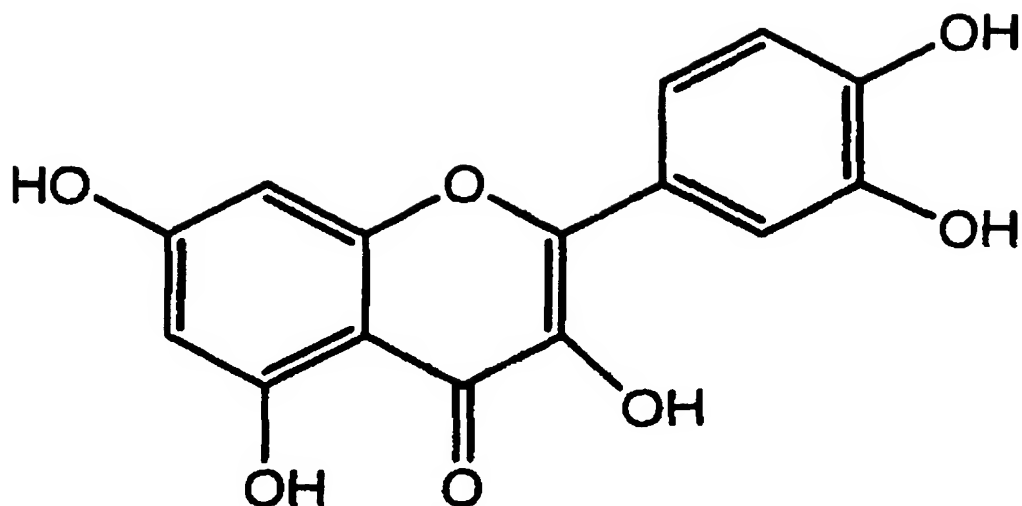
表 1

阻害効果	化合物	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ における 細胞生存度(%)	クラス
強い	ケルセチン	6.8 \pm 0.7	100.7	フラボノール
	ラムネチン	11.1 \pm 2.1	96.5	フラボノール
	エリカテキ	12.3 \pm 0.4	88.8	フラバノン
	ルテオリン	12.7 \pm 0.4	99.2	フラボン
	ゲニステイン	14.3 \pm 1.4	88.3	イソフラボン
	フィセチン	17.1 \pm 2.9	87.6	フラボノール
	ケンフェロール	24.3 \pm 2.1	94.7	フラボノール
	フロレチン	34.7 \pm 3.4	73.6	ジヒドロカルコン
弱い	カテキン	144.1 \pm 25.4	78.8	フラバノール
	エピカテキン	220.3 \pm 17.0	79.5	フラバノール
効果なし	エピガロカテキン	>500		フラバノール
	ミリセチン	>500		フラボノール

表 1 で示すように、抑制効果は、強い、弱い、抑制効果なしの 3 つのグループに分類できた。これらの中で、フラボノールであるケルセチン(quercetin)(I)が、最も強い COX-2 プロモーター転写活性の抑制効果(IC₅₀=6.8 \pm 0.7 μ M)を示した。

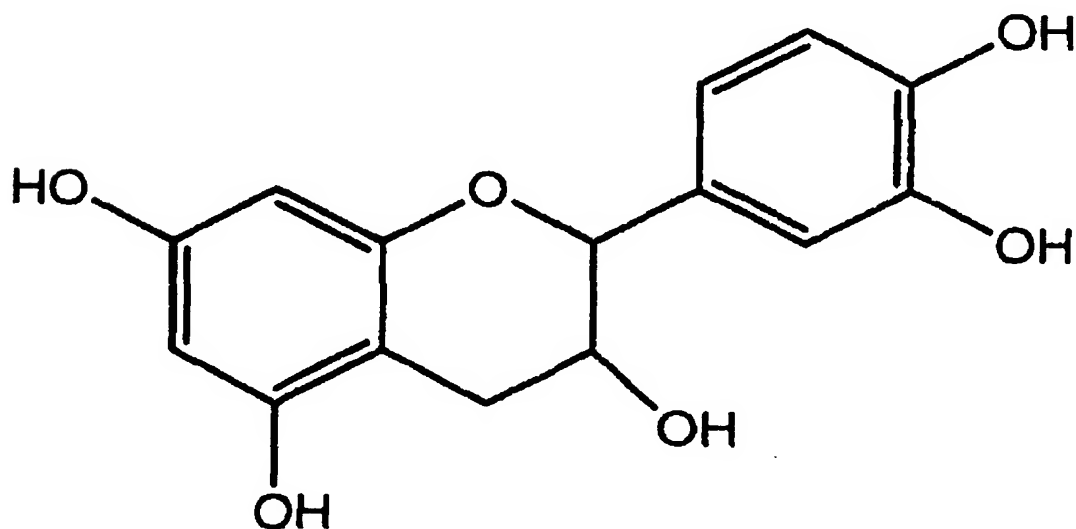
- 17 -

(I) ケルセチン



一方、フラバノールであるエピカテキン (IX) は、COX-2 プロモーター転写活性に対し非常に弱い抑制効果 ($IC_{50}=220.3 \pm 17.0 \mu M$) を示した。

(IX) エピカテキン



IC_{50} の濃度で、TGF α およびフラボノイドと共に 48 時間培養した後では、いずれのサンプルでも細胞生存率の顕著な減少は見られなかった。

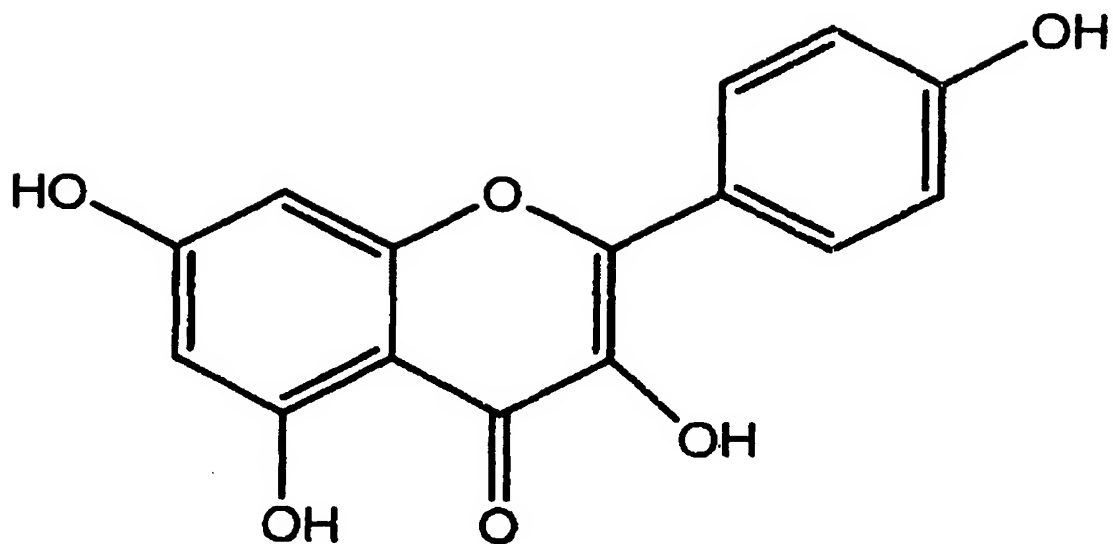
〔実施例 2〕 COX-2 転写阻害活性を有する構造の決定

(1) フラボノールおよびフラバノールにおける阻害活性を有する構造の推察

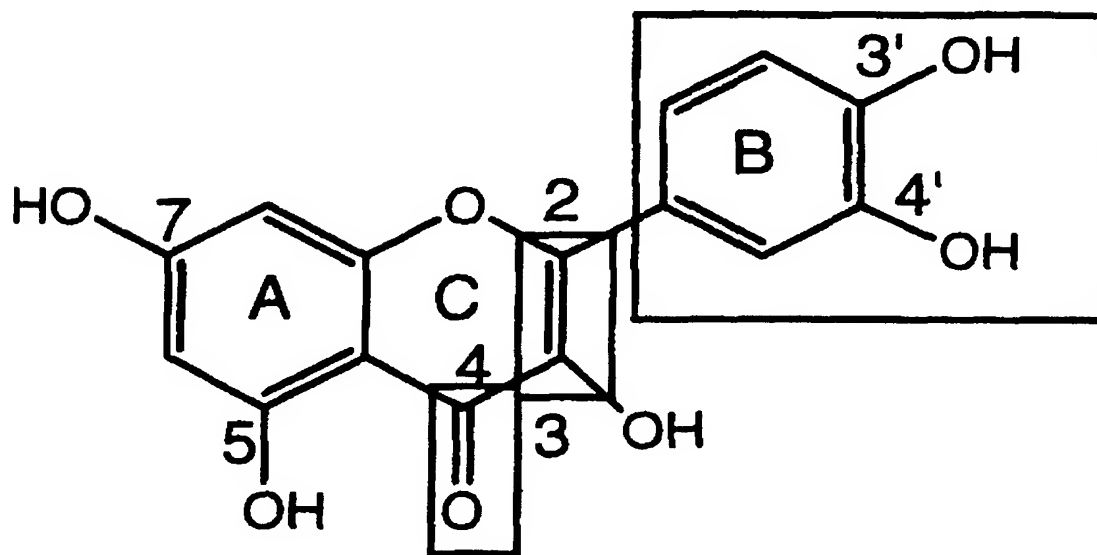
テストしたフラボノイドの中で、ミリセチンを除いて、フラボノールは COX-2 プロモーターの強いサプレッサーであった。反対に、フラバノールはエピガロカテキン(epigallocatechin)を除いて、COX-2 プロモーターの弱いサプレッサーであった。フラバノンに属するエリオチクチオール(eriodictyol)、イソフラボンに属するゲニステイン(genistein)、ジヒドロカルコンに属するフロレチン(phloretine)は全て、C 環上 (X 参照) に 4-オキシ基を有し、COX-2 プロモーターの強いサプレッサーであった。今回の実験では、4-オキシ基を有する化合物は全て、ミリセチンを除いて COX-2 プロモーターの強いサプレッサーであった。反対に、エピガロカテキンを除いて、4-オキシ基を欠く化合物は全て、COX-2 プロモーターの弱いサプレッサーであった。また、B 環に 3 つの OH 基を有するミリセチン、およびエピガロカテキンは、COX-2 プロモーター転写活性を抑制しなかった。ケンフェロール (VII) とケルセチン (I) を比較すると、B 環の 3'-、4'-OH 基 (X 参照) が、COX-2 プロモーター転写活性の抑制効果を上昇させているものと考えられる。

- 19 -

(VII) ケンフェロール



(X) ケルセチン



以上の点から、C環上の4-オキシ基、およびB環上の3'、4'-OH基が、COX-2の転写活性の抑制に、深く関与しているものと推察される。

(2) 酸素原子の電子密度の計算法

- 20 -

フラボノイドの7位の水酸基の酸素原子の電子密度、もしくはレスアセトフェンおよび3,5-ジブromo-2,4-ジヒドロキシアセトフェノンの対応する水酸基の酸素原子の電子密度を、半経験的定量法(semi empirical quantum mechanical method AM-1)により、MOPAC ver 6.3 (ソニー製)で計算した。初期の幾何学的構造を、標準の化学結合の長さ、および角度から構築した。次に、幾何学的構造を、MOPAC プログラムのアルゴリズムを利用し、完全に最適化した。

(3) レゾルシノール部分の酸素電子密度の計測

化合物の電子密度と COX-2 プロモーター転写活性における阻害効果との関係を調べるために、フラボノイドのA環上(X参照)の5-および7-酸素の電子密度を、「semi empirical quantum mechanical method AM-1」法により計測した(表2)。

表 2

阻害効果 (クラス)	化合物	7-酸素の電子密度	5-酸素の電子密度
強い (フラボノール)	ケルセチン	-0.2801	-0.2554
	リチナゲオール	-0.2814	-0.2490
	ルテオリン	-0.2823	-0.2555
	ケンフェロール	-0.2807	-0.2577
弱い (フラバノール)	カテキン	-0.2933	-0.2790
	エピカテキン	-0.2938	-0.2801

強いサプレッサーであるケルセチン (I) と弱いサプレッサーであるエピカテキン (IX) とを比較すると、エピカテキンは7-酸素の電子密度がより高く計測された。同じB環構造およびレゾルシノール部分を有するフラボノイドでは、7-酸素電子密度と COX-2 プロモーター転写活性の抑制効果との間で逆の相関関係にあった。B環の水酸基の数が異なるケンフェロール (VII) は、電子密度と COX-2

- 2 1 -

プロモーター転写活性との間で相関関係は見られなかった。5-酸素の電子密度と COX-2 プロモーター転写活性との間でも、相関関係は見られなかった。

以上の点から、7-酸素の電子密度が COX-2 の転写活性の抑制に関与していることが示唆された。

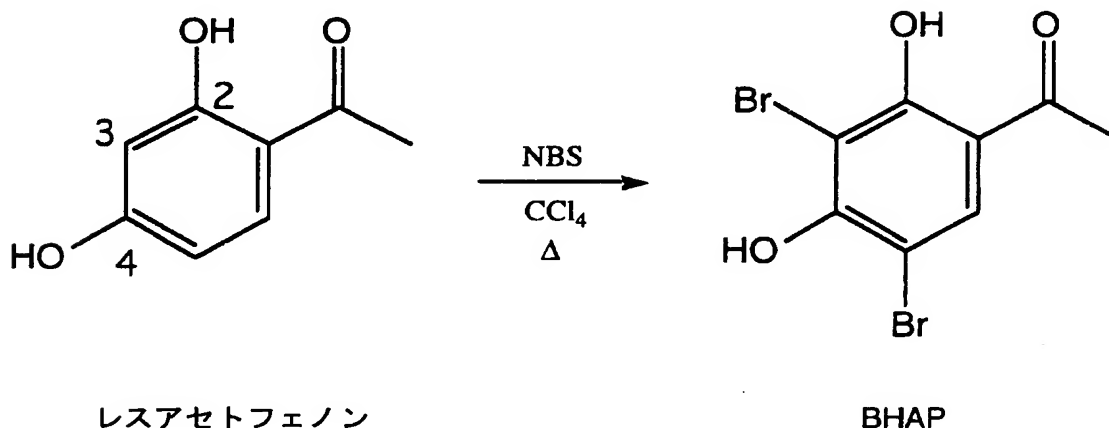
(4) レスアセトフェノンおよびその臭化物ホモログの COX-2 の転写抑制効果

(a) 3,5-ジブロモ-2,4-ジヒドロキシアセトフェノンの生合成

レゾルシノール部分の 7-酸素の電子密度と COX-2 プロモーター転写活性の抑制との関係を調べるために、小さな分子であるレスアセトフェノンを臭化し、レゾルシノール部分の酸素の電子密度を減少させた。

0.15 g の 2,4-ジヒドロキシアセトフェノンを、10 ml の CCl_4 に懸濁した。0.39 g の N-ブロモスクシンイミド(NBS)を、この溶液へ加えた。反応液を攪拌し、温水槽で4時間加温した。2,4-ジヒドロキシアセトフェノンから 3,5-ジブロモ-2,4-ジヒドロキシアセトフェノン(BHAP)への反応を表す式を下記反応式(1)に示す。

反応式(1)



反応後、減圧下で溶媒を除いて残渣をメタノールから再結晶化させ、無色の結晶 0.13 g の 3,5-ジブロモ-2,4-ジヒドロキシアセトフェノン(3,5-dibromo-2,4-

- 2 2 -

dihydroxyacetophenone)を得た。この化合物の理化学的性質は以下のとおりである。

陽イオン EI-MS (m/z): 308 ($M-2$)⁺, 310 (M)⁺, 312 ($M+2$)⁺

¹H-NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ; 2.60(3H, s, CH₃), 8.12(1H, s, H-6), 11.05(1H, br s, 2-OH)

(b) 実験結果

BHAP は COX-2 プロモーター転写活性を、投与量に依存して抑制した (図 2)。興味深いことに BHAP は、BHAP より酸素電子密度が高いレスアセトフェノンより、COX-2 プロモーター転写活性の抑制が 10 倍強いことが分かった (表 3)。

表 3

化合物	4-酸素の電子密度	2-酸素の電子密度	IC ₅₀ (%)
BHAP	-0.2376	-0.2330	23.2±3.6
レスアセトフェノン	-0.2877	-0.3142	237.3±25.4

このことから、7-酸素の低電子密度が、COX-2 転写活性の抑制に深く関与しているものといえる。

以上の結果をまとめると、フラボノイド化合物の

(a) C 環上の 4-オキソ基、

(b) A 環上の 7-酸素の低電子密度、

(c) B 環上の 3', 4'-ジヒドロキシ構造

が、COX-2 プロモーター転写活性の抑制に関与しているものと考えられる。

従って、一般式 (1) で示した化合物は、COX-2 発現抑制剤となることが期待される。

産業上の利用の可能性

本発明は、新規な COX-2 の発現抑制剤を提供する。本発明によって提供される COX-2 の発現抑制剤は、いずれの化合物も、毒性が低いことに加えて構造が単純であり、今後の創薬に有用である。また本発明の COX-2 発現抑制剤からなる COX-2 を過剰発現している腫瘍の予防剤は、選択性に優れた薬剤として期待できる。すなわち COX-1 とは異なる遺伝子によってコードされている COX-2 の発現に作用することから、理論的には COX-1 の活性に影響を与えず、胃腸障害のような副作用を伴わない薬剤とすることができる。

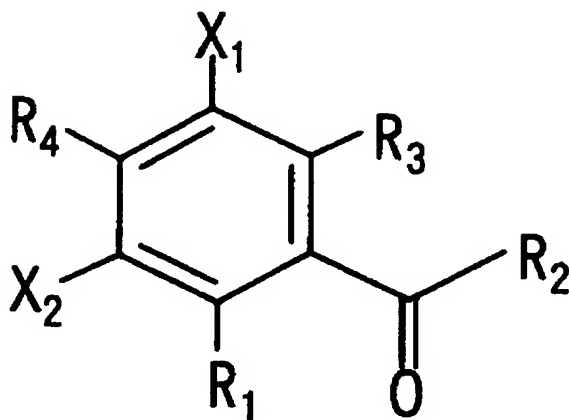
本発明によって、COX-2 の発現抑制のために必要な化合物の構造が明らかにされた。また、COX-2 発現抑制作用を左右する、いくつかの重要な構造上の特徴を明らかにした。特に、COX-2 発現抑制作用と化合物の構造の関連性については、薬剤の開発においてきわめて重要な情報でありながら、従来はまったく情報が蓄積されていなかった。本発明は、前記ジヒドロキシアセトフェノン誘導体の A 環における水酸基とハロゲンによる置換、並びに R2 をベンゼン環が水酸基で置換されたベンジル基とすることが、COX-2 発現抑制作用と密接に関連していることを初めて明らかにした。これらの知見に基づいて、COX-2 の発現抑制剤として利用することができる化合物のスクリーニングと開発のスピードが飛躍的に向上する。このように、本発明は、COX-2 発現抑制剤の構造活性相関の基礎となる知見を与えた点において大きな意義を持つ。

- 24 -

請求の範囲

1. 下記一般式(1)で示されるジヒドロキシアセトフェノン誘導体、またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有するシクロオキシゲナーゼ-2発現抑制剤。

一般式(1)



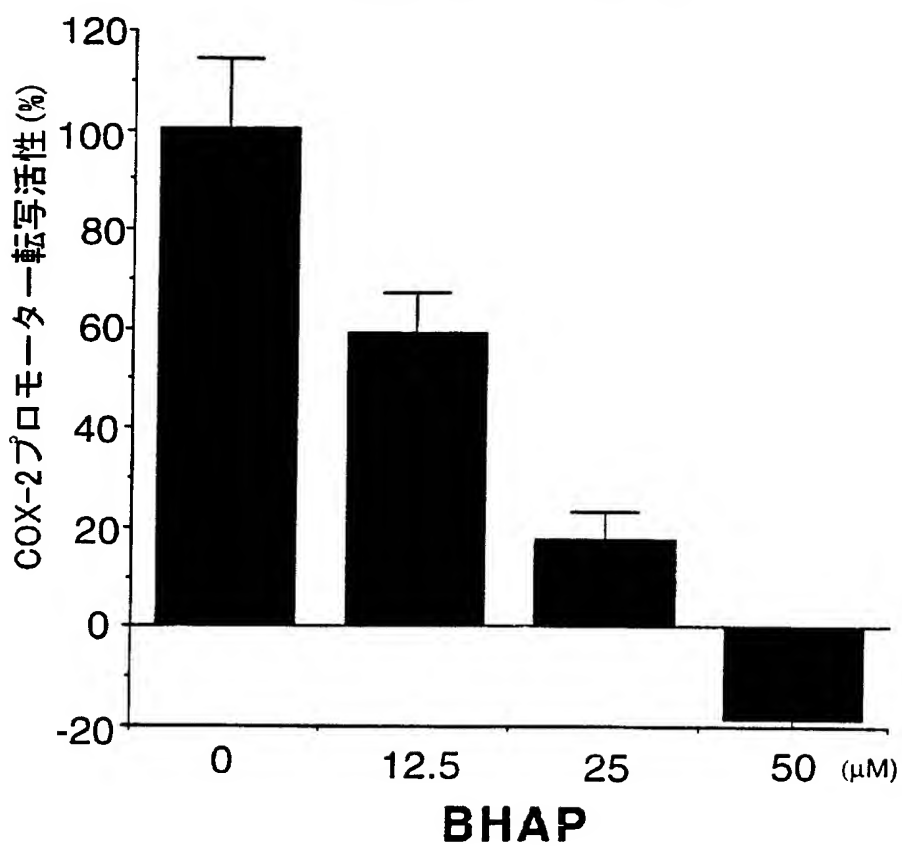
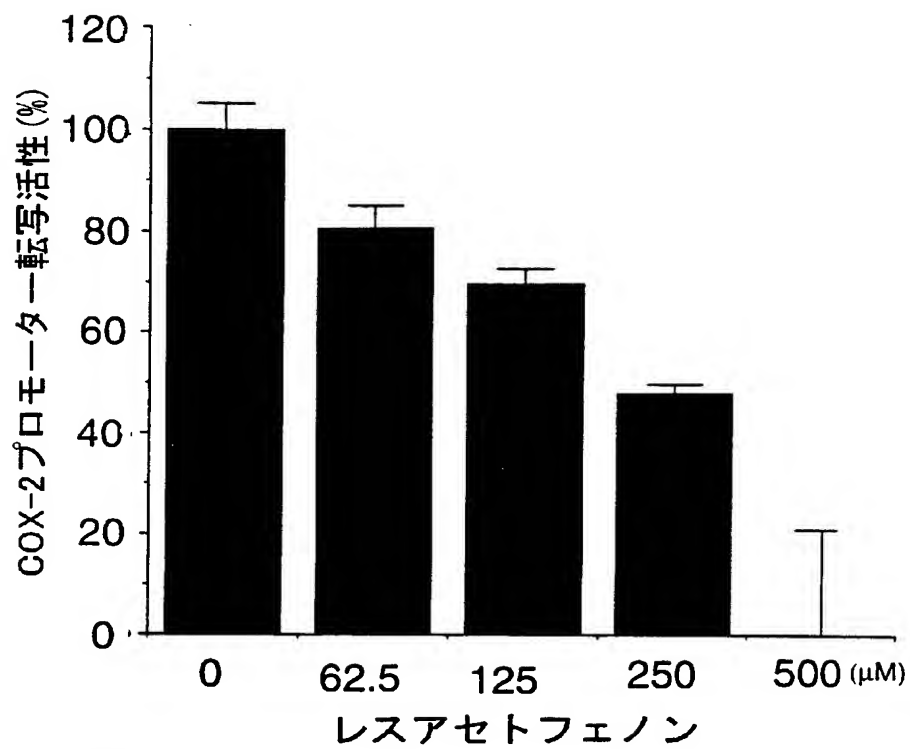
式中、X₁ と X₂ は、同時にまたは独立して水素原子、またはハロゲン、
R₁ は、水素原子または水酸基、
R₂ は、アルキル基、または置換アルキル基、
R₃ は、水素原子、水酸基、オキシアルキル基、または R₂ のアルキル基または置換アルキル基と環を形成しても良いオキシアルキル基もしくは水酸基、および
R₄ は、水酸基、またはオキシアルキル基を示す、
ただし、R₁、R₃、および R₄ の少なくとも一つは水酸基である
2. X₁ と X₂ が、同時にハロゲンである請求項 1 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤。

- 25 -

3. ハロゲンが Br である請求項 2 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤。
4. R₂ が置換アルキル基である請求項 1 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤。
5. 置換アルキル基がハロゲン化メチル基、またはそのベンゼン環が 3 位と 4 位において水酸基で置換されているフェネチル基である請求項 4 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤。
6. 一般式 (1) で示される化合物が、ラムネチン、エリオチクチオール、ルテオリン、フィセチン、およびフロレチンからなる群から選択されるいずれかの化合物である請求項 1 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤。
7. 請求項 1 に記載のシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制剤からなる、シクロオキシゲナーゼ-2 を過剰発現している腫瘍の予防剤。

1 / 1

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by Director General of Agency of National Cancer Center
The Organization for Pharmaceutical Safety and Research

<120> Suppressors of Cyclooxygenase-2 Transcriptional
Activity

<130> OPS-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-302979

<151> 1999-10-25

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

ggaactcttc actctatcct gctatataag gtga

34

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

tcttgacgct cactgcaatg cgtatgacaa tt

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K31/352, 31/12, A61P43/00, 35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K31/352, 31/12, A61P43/00, 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN) , EMBASE (STN) , MEDLINE (STN))		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIANG Yu-Chih et al., "Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages." Carcinogenesis, October 1999, Vol.20, No.10, pages 1945 to 1952 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN.132:8722	1-7
Y		1-7
Y	JP, 8-157361, A (Toyama Chemical Co., Ltd.), 18 June, 1996 (18.06.96) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN.125:132769	1-7
PX	MUTOH Michihiro et al., "Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure." Carcinogenesis, 2000, Vol.21, No.5, pages 959 to 963 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN.133:99077	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 16 January, 2001 (16.01.01)		Date of mailing of the international search report 30 January, 2001 (30.01.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, 31/12, A61P43/00, 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, 31/12, A61P43/00, 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	LIANG Yu-Chih et al., "Suppression of inducible cyclo-oxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages." Carcinogenesis, Oct. 1999, Vol.20, No.10, pages 1945 to 1952 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN.132:8722	1-7 1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.01.01

国際調査報告の発送日

30.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

印

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-157361, A (富山化学工業株式会社) 18. 6月. 1996 (18. 06. 96) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN. 125:132769	1-7
PX	MUTOH Michihiro et al., "Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure." Carcinogenesis, 2000, Vol. 21, No. 5, pages 959 to 963 & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN. 133:99077	1-7